



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer : 0 653 631 A2

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer : 94810630.7

51 Int. Cl.<sup>6</sup> : G01N 27/447

22 Anmeldetag : 02.11.94

30 Priorität : 11.11.93 CH 3392/93

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung :  
17.05.95 Patentblatt 95/20

84 Benannte Vertragsstaaten :  
CH DE FR GB IT LI SE

71 Anmelder : CIBA-GEIGY AG  
Klybeckstrasse 141  
CH-4002 Basel (CH)

72 Erfinder : Manz, Andreas, Dr.  
Bückenweg 43  
CH-4126 Bettingen (CH)  
Erfinder : Effenhauser, Carlo S., Dr.  
Schutzackerstrasse 18  
D-79756 Weil am Rhein (DE)

54 Vorrichtung und Verfahren zur elektrophoretischen Trennung von fluiden Substanzgemischen.

57 Eine Vorrichtung zur elektrophoretischen Trennung von komplexen fluiden Substanzgemischen weist ein Kanalsystem (21.2,22) für ein Trägermedium (C), eine Injektionsvorrichtung (3) für die Injektion eines aufzutrennenden Substanzgemisches (S) in das Trägermedium (C) und eine Trennstrecke (2) zur Auftrennung des Substanzgemisches (S) in einem entlang der Trennstrecke (2) angelegten elektrischen Feld auf. Flussabwärts der Injektionsvorrichtung (3) für das aufzutrennende Substanzgemisch (S) ist in einem Abstand davon eine zweite Trennstrecke (4) zur weiteren Auftrennung des Substanzgemisches (S) in einem entlang der zweiten Trennstrecke (4) angelegten elektrischen Feld vorgesehen. Die zweite Trennstrecke (4) ist gegenüber der ersten (2) um einen Winkel ( $\alpha$ ) geneigt angeordnet. Der Kreuzungsbereich der ersten (2) und der zweiten Trennstrecke (4) bildet eine zweite Injektionsvorrichtung (5) für das teilweise aufgetrennte Substanzgemisch (S) in ein zweites Trägermedium (E). Das fluide Substanzgemisch (S) wird in der ersten Injektionsvorrichtung (3) in das Trägermedium (C) injiziert und anschliessend in dem elektrischen Feld, das entlang der ersten Trennstrecke (2) angelegt wird, aufgetrennt. Danach wird das teilweise aufgetrennte Substanzgemisch (S) flussabwärts der ersten Trennstrecke (2) in das zweite Trägermedium (E) injiziert und in dem entlang der zweiten Trennstrecke (4) angelegten elektrischen Feld weiter in seine Komponenten aufgetrennt.

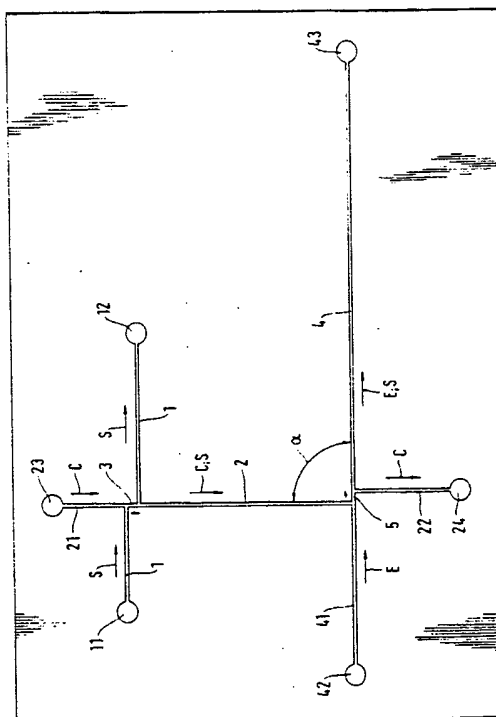


Fig. 1

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur elektrophoretischen Trennung von fluiden Substanzgemischen gemäss Oberbegriff des Patentanspruchs 1 bzw. gemäss Oberbegriff des Patentanspruchs 19.

Elektrophoretische Trennmethode beruhen auf der unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeit der einzelnen Komponenten einer zu untersuchenden Probe in einem Trägermedium bei angelegtem elektrischem Feld. Sehr weit verbreitet ist die Kapillarelektrophorese, bei der ein Trägermedium und eine zu untersuchende Probe in einem Kapillarsystem transportiert werden, welches eine kapillare Trennstrecke umfasst, zwischen deren Enden das elektrische Feld angelegt wird. Der Transport des Trägermediums im Kapillarsystem und die Injektion der zu untersuchenden Probe in das Trägermedium kann mit Hilfe von Pumpen und Ventilen oder mit elektrischen Feldern erfolgen, die in verschiedenen Abschnitten des Kapillarsystems entsprechend angelegt werden. Die einzelnen Komponenten der in das Trägermedium injizierten Probe wandern unterschiedlich schnell in dem elektrischen Feld der Trennstrecke, wodurch die Probe aufgetrennt wird. Die einzelnen Komponenten können mit Hilfe eines an die kapillare Trennstrecke angeschlossenen Detektors festgestellt werden. Für die gleichzeitige Analyse verschiedener Proben sind auch schon Trennanordnungen mit mehreren parallelen Kapillaren vorgeschlagen worden (Anal. Chem. 1992, 64, 967-972).

In der DNA-Sequenzierung werden beispielsweise gel-gefüllte Kapillaren als Trennstrecke eingesetzt. Bei diesem Trennverfahren erfolgt kein Transport des Trägermediums, des Gels, sondern es wandert nur die in das Gel injizierte Probe im angelegten elektrischen Feld. Eine typische Trennleistung (welche auch theoretische Trennstufenzahl genannt wird) eines elektrophoretischen Trennsystems mit derartigen gel-gefüllten Kapillaren beträgt beispielsweise etwa 250 "Peaks" in einer Zeit von 30 Minuten.

In der US-A-4,908,112 wird vorgeschlagen, verzweigte Kapillarsysteme inklusive Trennstrecke zu miniaturisieren. Dabei ist das Kapillarsystem auf einem Halbleiterchip angeordnet. Der Transport des Trägermediums und die Injektion der zu trennenden Probe erfolgt mit Hilfe von zwischen einzelnen Streckenabschnitten des Kapillarsystems schaltbaren elektrischen Feldern. Die Abmessungen des Kanalsystems sind sehr klein, die erzielbaren Feldstärken hingegen sind sehr gross. Auf diese Weise kommt man mit sehr kleinen Mengen an Trägermedium und mit sehr kleinen Probenvolumina aus. Zudem ist das Trennverfahren bei den angelegten grossen Spannungen, typischerweise etwa 30 kV, sehr schnell durchführbar.

Eine weitere sehr verbreitete elektrophoretische Trennmethode stellt die Gel-Elektrophorese dar. Diese Trennmethode, bei der die Trennung der Probe in ihre Bestandteile nicht in Lösung sondern in einem stationären Trägermaterial, einem Gel, erfolgt, wird auch als Elektropherographie bezeichnet. Bei dem elektropherographischen Verfahren wird die zu trennende Probe vorzugsweise in der Mitte eines mit Puffer getränkten Trägermaterials (Pherogramm) strichförmig aufgetragen und an den Enden des Trägermaterials eine elektrische Spannung angelegt. Je nach Wanderungsrichtung und Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Komponenten wird die Probe getrennt. Dabei wandern die verschiedenen geladenen Komponenten zu den jeweils entgegengesetzt geladenen Polen hin, während die neutralen an der Auftragstelle verbleiben. Bei einem kontinuierlichen Trennverfahren fliesst durch eine vertikale Platte von Trägermaterial eine Pufferlösung. Die Probe wird möglichst am oberen Ende der Platte zugegeben. Die elektrophoretische Trennung wird durch ein senkrecht zum Pufferfluss angelegtes elektrisches Feld hervorgerufen.

Die Gel-Elektrophorese ist eine etablierte Trennmethode für geladene Biopolymere. Häufig werden Polyacrylamid-Gele (PAGE) für die Trennung verwendet. Die Porengrösse der Polyacrylamid-Gele erlaubt eine Trennung nach Ladung und sterischer Hinderung der Probe-Moleküle im Gel. Bei Zugabe von Natrium-Dodecylsulfat (SDS für Sodium-Dodecyl-Sulfat) erhält man eine gute Korrelation der Migrationsdistanz der aufgetrennten Probenmoleküle mit der entsprechenden Molmasse, die aber unabhängig von der Ladung der Moleküle ist. Eine isoelektrische Fokussierung (IEF bzw. IF) als Vorstufe zur SDS-PAGE-Gel-Elektrophorese ermöglicht auch die Auftrennung vieler extrem komplexer Substanzgemische.

Eine mittlerweile etablierte Weiterentwicklung der Gel-Elektrophorese stellt die sogenannte 2D-Gel-Elektrophorese dar, bei der eine Probe nach unterschiedlichen Gesichtspunkten in zwei Dimensionen (2D) aufgetrennt wird. Eine derartige 2D-Gel-Elektrophorese Trennanordnung ist beispielsweise in "A.T. Andrews, Electrophoresis, Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications, Clarendon Press, Oxford 1986, Seiten 223-230" beschrieben. Diese 2-dimensionale Trennmethode wird vor allem als Kombination von Isoelektrischem Fokussieren in der ersten Dimension und einer Gel-Elektrophorese, beispielsweise einer SDS-PAGE-Gel-Elektrophorese, in der zweiten Dimension benützt. Das resultierende Gel-Pattern gibt in der ersten Dimension Aufschluss über den isoelektrischen Punkt der jeweiligen Komponente und in der zweiten Dimension über die Molmasse der betreffenden Komponente. Die typische Trennleistung bei der 2D-Gel-Elektrophorese liegt bei einer Peak-Kapazität von etwa 10,000 in einer Zeit von mehr als zwei Stunden.

Zwar sind mit der 2D-Gel-Elektrophorese sehr hohe Trennleistungen erzielbar, jedoch ist an dieser Methode nachteilig, dass sie sehr langsam ist. Zunächst muss die Probe auf einem ersten Gel in der ersten Dimension aufgetrennt werden. Darauf folgt ein üblicherweise mühsames Zusammenfügen des ersten mit einem

zweiten Gel, in dem die Trennung in der zweiten Dimension erfolgen soll. Bedingt durch die lange Analysezeit kommt es im freien Gel zur Diffusion der aufgetrennten Komponenten, was zu einer unerwünschten Bandenverbreiterung führen kann. Die für die Auftrennung im Gel erforderliche elektrische Spannung kann nur beschränkt erhöht werden, typischerweise liegt sie bei etwa 2 kV. Bei höheren Spannungen wird Joulsche Wärme erzeugt, welche zur Zersetzung der des Gels und der Probe führen kann.

Es besteht daher keine Möglichkeit, die erforderlichen langen Analysezeiten zu verringern, ohne dabei gleichzeitig an Auflösung (Trennleistung) zu verlieren. Die sehr langen Analysezeiten sind daher ein entscheidendes Hemmnis für den Einsatz der 2D-Gel-Elektrophorese für die Trennung von hochkomplexen Substanzgemischen.

Bei der Kapillarelektrophorese kann die Analysezeit durch erhöhte Spannung zwischen den Enden der Trennstrecke deutlich verringert werden. Bei miniaturisierten Kapillarelektrophoresesystemen auf Microchip-Basis werden Spannungen von typischerweise etwa 5-40 kV eingesetzt; daraus resultieren Analysezeiten von weniger als einer Minute. Allerdings können mit Hilfe der Kapillarelektrophorese nur relativ einfache Substanzgemische getrennt werden. Eine Kopplung vieler Trennkapillaren nebeneinander zur Erreichung einer "Zweidimensionalität", um auch hochkomplexe Substanzgemische auftrennen zu können, würde bei miniaturisierten Systemen hingegen Verbindungsstücke mit sub-Nanoliter Volumina erfordern. Derartige Verbindungsstücke sind aber, falls überhaupt, nur sehr schwierig und teuer herstellbar. Im Falle sehr kurzer Kapillaren-Trennstrecken für sehr schnelle Trennungen ist der Störeinfluss der Totvolumina der Verbindungsstücke besonders gross. Daher müssten diese Totvolumina verschwindend klein gehalten werden, was praktisch unmöglich erscheint. Eine Ausbildung der Trennstrecke des miniaturisierten Kapillarelektrophoresesystems als flaches Bett, in Analogie zur 2D-Gel-Elektrophorese, würde die Diffusion der aufgetrennten Komponenten fördern und dadurch zu einer deutlichen Verschlechterung der Trennleistung führen.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur elektrophoretischen Trennung von, insbesondere komplexen, fluiden Substanzgemischen zu schaffen, die so leistungsfähig sind wie die 2D-Gel-Elektrophorese, und welche kurze Trenn- bzw. Analysezeiten erlauben.

Diese und noch weitere Aufgaben sowie die Nachteile der Vorrichtungen und Verfahren des Standes der Technik werden durch eine Vorrichtung und durch ein Verfahren gemäss Kennzeichen des Patentanspruchs 1 bzw. des Patentanspruchs 19 gelöst. Besonders bevorzugte Ausführungs- bzw. Verfahrensvarianten der Erfindung sind jeweils Gegenstand der abhängigen Patentansprüche.

Insbesondere wird durch die Erfindung eine Vorrichtung zur elektrophoretischen Trennung von komplexen fluiden Substanzgemischen geschaffen, die ein Kanalsystem für ein Trägermedium, eine Injektionsvorrichtung für die Injektion eines aufzutrennenden Substanzgemisches in das Trägermedium und eine Trennstrecke zur Auftrennung des Substanzgemisches in einem entlang der Trennstrecke angelegten elektrischen Feld umfasst. Flussabwärts der Injektionsvorrichtung für das aufzutrennende Substanzgemisch ist in einem Abstand davon eine zweite Trennstrecke zur weiteren Auftrennung des Substanzgemisches in einem entlang der zweiten Trennstrecke angelegten elektrischen Feld vorgesehen. Die zweite Trennstrecke ist gegenüber der ersten um einen Winkel geneigt angeordnet. Der Kreuzungsbereich der ersten und der zweiten Trennstrecke bildet eine zweite Injektionsvorrichtung für das teilweise aufgetrennte Substanzgemisch in ein zweites Trägermedium. Das fluide Substanzgemisch wird in der ersten Injektionsvorrichtung in das Trägermedium injiziert und anschliessend in dem elektrischen Feld, das entlang der ersten Trennstrecke angelegt wird, aufgetrennt. Danach wird das teilweise aufgetrennte Substanzgemisch flussabwärts der ersten Trennstrecke in das zweite Trägermedium injiziert und in dem entlang der zweiten Trennstrecke angelegten elektrischen Feld weiter in seine Komponenten aufgetrennt.

Die erfindungsgemässe Vorrichtung und das erfindungsgemässe Verfahren machen sich die Vorteile einer zweidimensionalen Auftrennung, wie sie aus der 2D-Gel-Elektrophorese bekannt ist, zunutze ohne dabei aber den Nachteil der sehr langen Trenn- bzw. Analysezeiten aufzuweisen. Der Vorteile der sehr guten Auftrennung auch hochkomplexer Substanzgemische wird verbunden mit den sehr kurzen Auftrenn- bzw. Analysezeiten, die insbesondere durch die miniaturisierten Kapillar-Elektrophoresesysteme ermöglicht werden. Durch die Erfindung wird ein zweidimensionales Kapillarelektrophoresesystem geschaffen, welches ohne Verbindungsstücke mit sub-Nanoliter Volumina auskommt. Das Verfahren erlaubt sehr schnelle Trennungen eines hochkomplexen Substanzgemisches, welche typischerweise unter einer Minute liegen. Die Trennleistungen sind deutlich höher als bei der konventionellen Kapillar-Elektrophorese. Wegen der kurzen Analysezeiten kann die Erfindung auch für eine quasi-kontinuierliche Analyse eingesetzt werden.

Vorzugsweise weisen die zwei Injektionsvorrichtungen für die Injektion des Substanzgemisches bzw. teilweise aufgetrennten Substanzgemisches Injektionsvolumina auf, welche geometrisch begrenzt sind. In einer bevorzugten Ausführungsvariante weist der Kreuzungsbereich der ersten Trennstrecke mit der zweiten Trennstrecke die Form eines Doppel-T Stücks auf, wobei die Balken der T-Stücke jeweils von der zweiten Trennstrecke gebildet sind. Auf diese Weise ist die zweite Trennstrecke durchgehend ausgebildet, während die Ein-

mündung der ersten Trennstrecke in die zweite und die Abzweigung von der zweiten Trennstrecke für den Abtransport des Gemisches aus erstem Trägermedium und aufzutrennendem Substanzgemisch entlang der Erstreckung der zweiten Trennstrecke gegeneinander versetzt angeordnet sind. Das teilweise aufgetrennte Substanzgemisch wird zur Injektion in das zweite Trägermedium zunächst schräg zur Transportrichtung in der ersten Trennstrecke transportiert. Danach wird es umgelenkt und vorzugsweise in einer zur ersten Trennstrecke parallelen Richtung zu einem Ausgang aus dem Kanalsystem transportiert. Die erste Injektionsvorrichtung ist völlig analog aufgebaut. Dort wird das noch ungetrennte Substanzgemisch zunächst schräg zur ersten Trennstrecke transportiert, sodann wieder in die erste Transportrichtung umgelenkt und schliesslich an einer Abzweigung stromabwärts der Einmündung in die erste Trennstrecke erneut umgelenkt und vorzugsweise parallel zu der ursprünglichen Transportrichtung zu einem Ausgang transportiert. Die Injektion erfolgt auf diese Weise pfropfenweise, wobei das injizierte Volumen jeweils vom Abstand der Einmündung von der zugehörigen Abzweigung und vom Querschnitt der ersten und zweiten Trennstrecken abhängig ist.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante weisen die erste und die zweite Injektionsvorrichtung die Form eines Doppel-T Stücks auf, wobei die Balken der T Stücke der jeweils von der ersten bzw. von der zweiten Trennstrecke bzw. deren geradlinigen Verlängerungen gebildet sind.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind flussabwärts der ersten Injektionsvorrichtung weitere Trennstrecken zur weiteren Auftrennung des Substanzgemisches in einem entlang der jeweiligen Trennstrecke angelegten elektrischen Feld vorgesehen. Diese verlaufen gleichfalls schräg zu der ersten Trennstrecke und etwa parallel zueinander. Die Kreuzungsbereiche der weiteren Trennstrecken mit der ersten Trennstrecke bilden jeweils weitere Injektionsvorrichtungen, an denen das teilweise aufgetrennte Substanzgemisch in ein durch die weiteren Trennstrecken transportiertes zweites Trägermedium injiziert werden. Die Ausbildung der Injektionsvorrichtungen entspricht in diesem Fall vorzugsweise der bereits zuvor geschilderten. Diese besonders bevorzugte Ausführungsvariante erlaubt einen besonders vielfältigen Einsatz der Vorrichtung. Insbesondere können verschiedene Komponenten des in der ersten Trennstrecke teilweise aufgetrennten Substanzgemisches in die flussabwärts hintereinander kreuzenden und parallel zueinander verlaufenden weiteren Trennstrecken injiziert werden und dort nach besonderen Gesichtspunkten weiter aufgetrennt werden. Beispielsweise können in den einzelnen weiteren Trennstrecken unterschiedliche Feldstärkeverteilungen herrschen, ein Umstand der die weitere Auftrennung des Substanzgemisches entscheidend beeinflussen kann.

Vorzugsweise münden die Endstücke der weiteren Trennstrecken in ein gemeinsames Reservoir bzw. ein gemeinsames Auffangbehältnis für das zweite Trägermedium. Das Reservoir und das Auffangbehältnis weisen dabei vorzugsweise einen grösseren Querschnitt auf als die kapillarenförmigen Trennstrecken, um genügend Trägermedium für die Trennstrecken bereitzustellen bzw. einen Rückstau an zu verhindern. Vorzugsweise wird der Querschnitt der Zufuhr- bzw. Abfuhrkapillaren etwa 2- bis etwa 10'000-fach grösser gewählt als der Querschnitt der Trennstrecken. Dadurch ist auch mit zähflüssigeren Trägermedien ein störungsfreier Betrieb gewährleistet.

Eine besonders interessante Einsatzmöglichkeit für die erfindungsgemässe Trennvorrichtung besteht, wenn Mittel vorgesehen sind, welche es erlauben in dem zweiten Trägermedium im Reservoir bzw. im Auffangbehältnis einen pH-Gradienten einzustellen. Zu diesem Zweck werden als zweites Trägermedium beispielsweise Ampholyte eingesetzt. Elektroden erlauben es, ein elektrisches Feld im Ampholyten im Reservoir bzw. im Auffangbehältnis zu erzeugen. Die sauren und basischen Gruppen der Moleküle des Ampholyten richten sich im elektrischen Feld entsprechend aus, wandern und erzeugen auf diese Weise im Ampholyt einen temporären oder stabilen pH-Gradienten. Bei der derart modifizierten Vorrichtung wird jede weitere Trennstrecke von einem Trägermedium mit einem anderen pH-Wert durchströmt. Auf diese Weise kann das injizierte teilweise aufgetrennte Substanzgemisch in jeder Trennstrecke unter anderen Randbedingungen weiteraufgetrennt werden.

Um zu gewährleisten, dass die Trennung des Substanzgemisches in der ersten und in den weiteren Trennstrecken nach unterschiedlichen Gesichtspunkten erfolgt, wird das erste Trägermedium in der ersten Trennstrecke verschieden von dem in den weiteren Trennstrecken gewählt. Als Trägermedien werden vorzugsweise Elektrolytlösungen oder Gele gewählt. So kann beispielsweise in der ersten Trennstrecke eine isoelektrische Fokussierung des Substanzgemisches erfolgen (erste Dimension), während die eigentliche Auftrennung in die einzelnen Komponenten dann in den weiteren Trennstrecken erfolgt (zweite Dimension).

Die aufgetrennten Komponenten des Substanzgemisches werden vorzugsweise entweder zu einem bestimmten Zeitpunkt mit Hilfe einer Kamera optisch zweidimensional in zwei Ortskoordinaten detektiert oder mit einem linear scannenden optischen Detektor über Erfassung der Orts- und Zeitkoordinaten erfasst. Beide Detektionsverfahren sind gut integrierbar und mit digitalen Auswerteeinrichtungen kompatibel.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsvariante ist die erfindungsgemässe Trennvorrichtung miniaturisiert. Dabei sind das Kanalsystem, die Injektionsvorrichtungen, die Trennstrecken, die Zu- und Ab-

fuhrkapillaren in einem Materialplättchen aus Glas, Polymerfilm oder einem halbleitenden Material, vorzugsweise einkristallinem Silizium, erstellt, welches wahlweise mit einem Deckel, vorzugsweise aus Glas abdeckbar sein kann. Im Deckel und/oder im Materialplättchen sind jeweils separate Zuleit- und Ableitöffnungen für das erste und zweite Trägermedium und für das aufzutrennende Substanzengemisch vorgesehen. Die Trennstrecken sind vorzugsweise als Gräben ausgebildet, deren Tiefe etwa 0,1 µm bis etwa 1000 µm beträgt, und deren Breite etwa 1 µm bis etwa 500 µm beträgt. Dabei ist der Kanal jeweils umso schmaler je tiefer er ist und umgekehrt. Die derart ausgebildete miniaturisierte Trennvorrichtung ist mit den üblichen mikromechanischen oder aus der Halbleiterfertigung bekannten Herstellungsmethoden im Massenverfahren herstellbar und daher relativ kostengünstig zu realisieren. Zudem besteht die Möglichkeit, diverse elektronische Elemente, beispielsweise Elektroden für den Transport des Trägermediums mit Hilfe von elektrischen Feldern usw. auf dem "Analysechip" zu integrieren.

In einer Ausbildungsvariante der Vorrichtung werden als Trägermedien vorzugsweise wässrige Elektrolyten verwendet. Diese haben den Vorteil, dass sie mit Hilfe von elektrischen Feldern durch das Kanalsystem und die Trennstrecken transportiert werden können. Die dazu erforderlichen elektrischen Felder können beispielsweise über auf dem miniaturisierten Analysechip integrierte Elektroden vermittelt und gesteuert werden. Bei Kanälen und Trennstrecken mit entsprechend kleinen Querschnitten können diese auch ein- oder zweiseitig offen ausgebildet sein. Das Trägermedium und die Proben verbleiben in diesem Fall wegen der herrschenden Kapillarkräfte in den Kanälen bzw. den Trennstrecken.

Es können auch Gele als Trägermedien eingesetzt werden. Diese sind vorzugsweise stationär, das heisst in diesem Fall wird das Trägermedium nicht durch das Kanalsystem bzw. die Trennstrecken transportiert, sondern es wandert nur die Probe im Gel. In diesem Fall können das Kanalsystem und die Trennstrecken ein- oder sogar dreiseitig offen ausgebildet sein. Das gesamte Kanalsystem und die Trennstrecken können in dem Gel bzw. in den Gelen beispielsweise fotolithografisch, druck- oder prägetechnisch erstellt sein. Das Gel selbst bildet das Kanalsystem und die Trennstrecken - im Fall einer dreiseitig offenen Variante begrenzt nur das nichtleitende Trägermaterial für das Gel die Kanäle zusätzlich. Die Proben wandern in diesem Fall in den Gel-Kanälen ohne weitere Seitenführung.

Der Winkel unter dem die zweite(n) Trennstrecke(n) gegenüber der ersten geneigt ist (sind) beträgt etwa 30°-150° vorzugsweise etwa 90°. Dies erlaubt eine relativ grosse Flexibilität in der Gestaltung und Anordnung der Kanäle und Trennstrecken und die Zweidimensionalität des Trennvorgangs bleibt erhalten.

Vorzugsweise ist die Vorrichtung auch mit wenigstens einem Detektor für das in seine Komponenten aufgetrennte Substanzgemisch ausgestattet. Dies kann beispielsweise ein optischer oder eine auf elektrochemischer Basis funktionierender Detektor sein. Auf diese Weise kann die Vorrichtung für ganz bestimmte Analysen massgeschneidert sein, je nach Art des Detektors können beispielsweise ganz bestimmte Komponenten detektiert werden. Aufgrund der konzeptionsbedingten Miniaturisierbarkeit der Vorrichtung bieten sich vielfältige Einsatzmöglichkeiten beispielsweise in technologischen, wissenschaftlichen aber auch in medizinischen Anwendungsgebieten.

Im folgenden wird die erfindungsgemässe Vorrichtung mit allen ihr als wesentlich zugehörigen Details anhand von schematisch dargestellten beispielsweise Ausführungsvarianten näher erläutert. Das erfindungsgemässe Verfahren wird gleichfalls unter Bezugnahme auf die Darstellungen im Prinzip erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 ein erstes Ausführungsbeispiel der Trennvorrichtung, und
- Fig. 2 ein zweites Ausführungsbeispiel der erfindungsgemässen Vorrichtung.

Das in Fig. 1 dargestellte Ausführungsbeispiel stellt das Grundprinzip der erfindungsgemässen Vorrichtung zur elektrophoretischen Trennung von, insbesondere hochkomplexen, fluiden Substanzgemischen dar. Die Vorrichtung umfasst ein Kapillarsystem für den Transport eines Trägermediums C und eines aufzutrennenden Substanzgemisches S, eine Injektionsvorrichtung 3 für die Injektion des aufzutrennenden Substanzgemisches S in das Trägermedium C und eine vorzugsweise kapillarenförmige Trennstrecke 2, welche Bestandteil des Kapillarsystems ist. Während seines Transports durch die Trennstrecke 2 wird das Substanzgemisch in einem entlang der Trennstrecke angelegten elektrischen Feld aufgetrennt. Auf eine Darstellung der Elektroden, über die das elektrische Feld entlang der Trennstrecke 2 erstellt wird, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Das Trägermedium C und das Substanzgemisch S bzw. deren Strömungsrichtungen sind in der schematischen Darstellung durch entsprechend mit S bzw. C gekennzeichneten Pfeilen angedeutet. Die Enden der Kapillarenabschnitte 21 bzw. 22 münden in Zu- bzw. Abflüsse 23 bzw. 24, über die das fluide, vorzugsweise flüssige, Trägermedium C in das Kapillarsystem eingebracht und auch wieder abgeleitet werden kann. Entsprechend münden die Enden des Kapillarenabschnittes 1 in einen Einlass 11 bzw. einen Auslass 12 für das zu trennende Substanzgemisch S.

Der Kreuzungsbereich zwischen den Kapillarenabschnitten 1, über welche das Substanzgemisch S transportiert wird, und dem Kapillarenabschnitt 21,2,22, in dem das Trägermedium C transportiert wird, bildet die Injektionsvorrichtung 3 für das Substanzgemisch S in den Strom des Trägermediums C. Der Kreuzungsbereich

kann als einfacher geradliniger Kreuzungsabschnitt ausgebildet sein, vorzugsweise jedoch ist er derart ausgebildet, dass die Injektionsvorrichtung 3 für die Injektion des aufzutrennenden Substanzgemisches S in das Trägermedium C ein geometrisch begrenztes Injektionsvolumen aufweist. Dazu besitzt der Kreuzungsbereich die Form eines Doppel-T Stücks, wobei die Balken der T Stücke jeweils von der ersten Trennstrecke 2 bzw. deren geradliniger Verlängerung 21 gebildet sind. Das Injektionsvolumen wird auf diese Weise durch den Abstand zwischen der Einmündung des Kanalabschnitts 1 in die Trennstrecke 2 und dessen beispielsweise stromabwärts angeordneter Austrittsmündung und den Querschnitt der Trennstrecke 2 festgelegt.

Erfindungsgemäss ist stromabwärts in einem Abstand von der Injektionsvorrichtung 3 eine zweite vorzugsweise kapillarenförmige Trennstrecke 4 angeordnet, die gegenüber der ersten um einen Winkel  $\alpha$  geneigt angeordnet ist und im vorliegenden Ausführungsbeispiel vorzugsweise etwa vertikal zu der ersten Trennstrecke 2 verläuft. Die zweite Trennstrecke 4 erstreckt in vorzugsweise geradliniger Verlängerung in ein Kapillarenstück 41. Die zweite Trennstrecke 4 und das Kapillarenstück 41 sind gleichfalls Bestandteil des Kapillarsystems der Vorrichtung. Die Enden des Kapillarenstückes 41 bzw. der zweiten Trennstrecke 4 münden in Einlass- bzw. Auslassöffnungen 42 bzw. 43, über die ein zweites fluides, vorzugsweise flüssiges, Trägermedium E in das Kapillarsystem eingebracht bzw. wieder aus diesem entfernt werden kann.

Der Kreuzungsbereich der ersten und der zweiten Trennstrecke 2,4 ist derart ausgebildet, dass er eine zweite Injektionsvorrichtung 5 für das teilweise aufgetrennte Substanzgemisch S in das entlang der zweiten Trennstrecke 4 transportierte zweite Trägermedium E bildet. Der Kreuzungsbereich kann als einfacher geradliniger Kreuzungsabschnitt ausgebildet sein, vorzugsweise jedoch ist er derart ausgebildet, dass die Injektionsvorrichtung 5 für die Injektion des teilweise aufgetrennten Substanzgemisches S in das zweite Trägermedium E ein geometrisch begrenztes Injektionsvolumen aufweist. Dazu besitzt der Kreuzungsbereich die Form eines Doppel-T Stücks, wobei die Balken der T Stücke jeweils von der zweiten Trennstrecke 4 bzw. deren geradliniger Verlängerung, dem Kapillarenstück 41 gebildet sind. Das Injektionsvolumen wird auf diese Weise durch den Abstand zwischen der Einmündung der ersten Trennstrecke 2 in die zweite Trennstrecke 4 und der beispielsweise stromabwärts angeordneten Mündung des Kapillarenabschnitts 22, der in den Abfluss 24 für das erste Trägermedium C führt, und den Querschnitt der zweiten Trennstrecke 4 festgelegt.

Das in der ersten Trennstrecke 2 teilweise aufgetrennte Substanzgemisch S wird an der zweiten Injektionsvorrichtung 5 in den Strom des zweiten Trägermediums E injiziert und in einem entlang der zweiten Trennstrecke 4 angelegten elektrischen Feld weiter in seine Komponenten aufgetrennt. Auf eine Darstellung der Elektroden, über die das elektrische Feld entlang der Trennstrecke 4 erstellt wird, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Vorzugsweise ist das erste Trägermedium C vom zweiten E verschieden. Auf diese Weise können die erste und die zweite Trennung nach unterschiedlichen Gesichtspunkten erfolgen. Beispielsweise kann in der ersten Trennstrecke 2 zunächst eine isoelektrische Fokussierung des Substanzgemisches erfolgen, während die eigentliche Auftrennung in die einzelnen Komponenten in der nachgeschalteten zweiten Trennstrecke 4 erfolgt.

Bei dem in Fig. 2 dargestellten Ausführungsbeispiel der erfindungsgemässen Vorrichtung handelt es sich um eine Weiterentwicklung des Prinzipbeispiels aus Fig. 1. Im Anschluss an die erste Trennstrecke 2 ist stromabwärts eine Reihe weiterer Trennstrecken 4,4A-4J angeordnet. Die zusätzlichen Trennstrecken 4,4A-4J verlaufen alle etwa vertikal zu der ersten Trennstrecke 2 und etwa parallel zueinander. Die Kreuzungsbereiche der zusätzlichen Trennstrecken 4,4A-4J mit der ersten Trennstrecke 2 bilden Injektionsvorrichtungen 5,5A-5J für das teilweise getrennte Substanzgemisch S. Wie anhand des prinzipiellen Ausführungsbeispiels erläutert, ist das Injektionsvolumen der Injektionsvorrichtungen 5,5A-5J vorzugsweise geometrisch begrenzt. Alle Kreuzungsbereiche besitzen daher vorzugsweise die Form von Doppel-T Stücken, wobei jeweils die Querbalken der T's von den jeweiligen zusätzlichen Trennstrecken 4,4A-4J bzw. deren geradlinigen Verlängerungen, den Kapillarenstücken 41,41A-41J gebildet sind.

Die Enden der zusätzlichen Trennstrecken 4,4A-4J bzw. die Enden der Kapillarenstücke 41,41A-41J münden in ein gemeinsames Reservoir 44 für das zweite Trägermedium E bzw. in ein gemeinsames Auffangbehältnis 45. Im speziellen Fall ist das gemeinsame Reservoir 44 als Zufuhrkapillare und das gemeinsame Auffangbehältnis 45 als Abfuhrkapillare ausgebildet. Die Kapillaren 44,45 weisen einen grösseren Querschnitt auf als die Trennstrecken 2 bzw. 4,4A-4J. Die beiden Enden der Zufuhrkapillare 44 sind mit Öffnungen 46 und 47 verbunden, über die das zweite Trägermedium in die Zufuhrkapillare 44 eingespeist wird. Die beiden Enden der Abfuhrkapillare 45 münden in Auslassöffnungen 48 und 49, über die das Trägermedium-Substanz-Gemisch E+S wieder aus der Abfuhrkapillare 45 abtransportiert wird. Das vor-aufgetrennte Substanzgemisch S wird in eine Vielzahl von parallel zueinander verlaufenden weiteren Trennstrecken 4,4A-4J injiziert und dort parallel weiteraufgetrennt. Durch geeignete Wahl des Injektionszeitpunktes können ganz bestimmte "Vorkomponenten" des Substanzgemisches aus der ersten Trennstrecke 2 in die weiteren 4,4A-4J injiziert werden und dort weitergetrennt werden. Auch besteht die Möglichkeit, die weitere Auftrennung in die einzelnen weiteren Trennstrecken 4,4A-4J in unterschiedlich starken elektrischen Feldern durchzuführen.

Das Ausführungsbeispiel der Erfindung gemäss Fig. 2 kann auch noch dahingehend modifiziert werden, dass das zweite Trägermedium E in der Zufuhr- bzw. in der Abfuhrkapillare 44,45 einen pH-Gradienten aufweist. Dabei wird darauf geachtet, dass das zweite Trägermedium in der Zufuhr- und in der Abfuhrkapillare den gleichen Gradientenverlauf des pH-Wertes aufweisen. Auf diese Weise kann jede der zusätzlichen Trennstrecken 4,4A-4J mit Trägermedium mit einem anderen pH-Wert versorgt werden. Die Auftrennung des vor-

aufgetrennten Substanzgemisches erfolgt dann in jeder der zusätzlichen Trennstrecken 4,4A-4J in einem Trägermedium mit anderem pH-Wert, das heisst unter kontrollierbar unterschiedlichen Bedingungen.

Bei einer vereinfachten Variante des zweiten Ausführungsbeispiels findet keine Vor-Auftrennung des Substanzgemisches S statt, sondern dieses wird direkt über den Zufluss 23 anstelle eines ersten Trägermediums C in das Kapillarsystem eingespeist und an den Injektionsvorrichtungen 5,5A-5J in die weiteren Trennstrecken 4,4A-4J injiziert. Bei diesem vereinfachten Ausführungsbeispiel ohne Vor-Auftrennung kann auch auf den Kapillarenabschnitt 1, über den normalerweise das Substanzgemisch S in die erste Trennstrecke 2 eingebracht wird, entfallen.

Das Auslegungskonzept der erfindungsgemässen Vorrichtung erlaubt es auch, das Kapillarsystem, die Injektionsvorrichtungen 3,5,5A-5J, die Trennstrecken 2,4,4A-4J, die Zu- und Abfuhrkapillaren 44,45 in einem Materialplättchen aus Glas oder einem halbleitenden Material, vorzugsweise einkristallinem Silizium, zu erstellen. Dabei sind die Trennstrecken als Gräben ausgebildet, deren Breite etwa 1 µm bis etwa 500 µm beträgt, und deren Tiefe etwa 0,1 µm bis etwa 1000 µm beträgt. Das Materialplättchen ist an der Seite, die die Gräben aufweist, mit einem Deckel, vorzugsweise aus Glas abdeckbar. Im Deckel und/oder im Materialplättchen sind die Zuleit- bzw. Ableitöffnungen 23,24; 42,43; 46-48; 11,12 für das erste und zweite Trägermedium C,E und für das aufzutrennende Substanzgemisch S vorgesehen. Vorzugsweise sind sie als Einstecköffnungen für Anschlusskapillaren ausgebildet.

Zur Erfassung der einzelnen Komponenten des aufgetrennten Substanzgemisches ist ein (in den Fig. nicht dargestellter) Detektor für das in seine Komponenten aufgetrennte Substanzgemisch vorgesehen. Der Detektor ist beispielsweise eine optische Kamera, mit deren Hilfe die aufgetrennten Komponenten zu einem bestimmten Zeitpunkt zweidimensional in zwei Ortskoordinaten detektiert werden. Alternativ dazu können die aufgetrennten Komponenten des Substanzgemisches S mit einem linear scannenden optischen Detektor über Erfassung der Orts- und Zeitkoordinaten erfasst werden.

Die erfindungsgemässe Vorrichtung und das erfindungsgemässe Verfahren erlauben eine zweidimensionale Elektrophorese von hochkomplexen Substanzgemischen in einem Kapillarelektrophoresesystem. Dabei werden hohe Trennleistungen erreicht, ohne die aus der 2D-Gel-Elektrophorese bekannten langen Trenn- bzw. Analysezeiten in Kauf nehmen zu müssen. Die Vorrichtung und das Verfahren sind vielfältig einsetzbar. Die Wahl der Trägermedien richtet sich nach dem aufzutrennenden Substanzgemisch. Es können geeignete Elektrolytlösungen oder Gele mit oder ohne pH-Gradienten eingesetzt werden. In "Journal of Chromatography Library - Vol.52, Capillary Electrophoresis, 1992 Elsevier Science Publishers B.V., Seiten 173-183" sind Beispiele für Gele angegeben, die auch zusammen mit der erfindungsgemässen Vorrichtung einsetzbar sind. Die miniaturisierte Ausführungsvariante erlaubt den Einsatz von mikromechanischen und aus der Halbleiterproduktion bekannten Massenfertigungstechniken. Dadurch kann die erfindungsgemässe Vorrichtung relativ kostengünstig in grossen Stückzahlen hergestellt werden. Die miniaturisierte Ausführungsvariante als "Analysechip" erlaubt zudem die on-chip Integration von elektrischen Komponenten, beispielsweise der Elektroden für die Felderzeugung in den Trennstrecken.

#### Patentansprüche

1. Vorrichtung zur elektrophoretischen Trennung von komplexen fluiden Substanzgemischen umfassend ein Kanalsystem (21,2,22) für ein Trägermedium (C), eine Injektionsvorrichtung (3) für die Injektion eines aufzutrennenden Substanzgemisches (S) in das Trägermedium (C) und eine Trennstrecke (2) zur Auftrennung des Substanzgemisches (S) in einem elektrischen Feld, welches im Trägermedium (C) entlang der Trennstrecke (3) anlegbar ist, dadurch gekennzeichnet, dass zur weiteren Auftrennung des Substanzgemisches (S) wenigstens eine zweite Trennstrecke (4,4A-4J) mit einem zweiten Trägermedium (E) vorgesehen ist, in dem entlang der zweiten Trennstrecke (4,4A-4J) ein weiteres elektrisches Feld anlegbar ist, welche zweite Trennstrecke (4,4A-4J) gegenüber der ersten (2) um einen Winkel ( $\alpha$ ) geneigt angeordnet ist und in einem Abstand flussabwärts der Injektionsvorrichtung (3) für das aufzutrennende Substanzgemisch (S) derart verläuft, dass ein Kreuzungsbereich der ersten (2) und der zweiten Trennstrecke (4,4A-4J) eine zweite Injektionsvorrichtung (5,5A-5J) für das teilweise aufgetrennte Substanzgemisch (S) in das zweite Trägermedium (E) bildet.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das die zweite Injektionsvorrichtung (5,5A-5J) für die Injektion des teilweise aufgetrennten Substanzgemisches (S) ein Injektionsvolumen aufweist, welches geometrisch begrenzt ist.
- 5 3. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Kreuzungsbereich (5, 5A-5J) der ersten Trennstrecke (2) mit der zweiten Trennstrecke (4,4A-4J) die Form eines Doppel-T Stücks aufweist, wobei die Balken der T-Stücke jeweils von der zweiten Trennstrecke (4,4A-4J) bzw. deren geradliniger Verlängerung (41,41A-41J) gebildet sind.
- 10 4. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Injektionsvorrichtung (3) für die Injektion des aufzutrennenden Substanzgemisches (S) in das erste Trägermedium (C) ein geometrisch begrenztes Injektionsvolumen aufweist.
- 15 5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Injektionsvorrichtung (3) die Form eines Doppel-T Stücks aufweist, wobei die Balken der T Stücke jeweils von der ersten Trennstrecke (2) bzw. deren geradliniger Verlängerung (21) gebildet sind.
- 20 6. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass flussabwärts der ersten Injektionsvorrichtung (3) eine Anzahl weiterer Trennstrecken (4, 4A-4J) zur weiteren Auftrennung des Substanzgemisches (S) in einem entlang der jeweiligen Trennstrecke angelegten elektrischen Feld vorgesehen sind, die gegenüber der ersten Trennstrecke (2) um einen Winkel ( $\alpha$ ) geneigt und etwa parallel zueinander angeordnet sind, und deren Kreuzungsbereiche mit der ersten Trennstrecke (2) jeweils weitere Injektionsvorrichtungen (5,5A-5J) für das teilweise aufgetrennte Substanzgemisch (S) in ein zweites Trägermedium (E) bilden.
- 25 7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Endstücke der weiteren Trennstrecken (4,4A-4J) in ein gemeinsames Reservoir (44) bzw. ein gemeinsames Auffangbehältnis (45) für das zweite Trägermedium (E) münden, welche vorzugsweise einen grösseren Querschnitt aufweisen als die Trennstrecken.
- 30 8. Vorrichtung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Querschnitt des Reservoirs (44) bzw. des Auffangbehältnisses (45) etwa 2-10'000 mal grösser ist als der Querschnitt der Trennstrecken (4,4A-4J).
- 35 9. Vorrichtung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Reservoir (44) und das Auffangbehältnis (45) mit Mitteln ausgestattet sind, welche es erlauben in dem zweiten Trägermedium (E) einen pH-Gradienten einzustellen.
- 40 10. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das erste und das zweite Trägermedium (C,E) unterschiedliche Medien sind.
- 45 11. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Kanalsystem (21,2,22), die Injektionsvorrichtungen (3,5,5A-5J), die Trennstrecken (2,4,4A-4J), ggf. das Reservoir (44) und das Auffangbehältnis (45) und allfällige weitere Verlängerungskanäle (41,41A41J) in einem Materialplättchen aus Glas, einem Polymerfilm oder einem halbleitenden Material, vorzugsweise einkristallinem Silizium, erstellt sind, welches vorzugsweise mit einem Deckel, beispielsweise aus Glas abdeckbar ist, und dass jeweils separate Zuleit- und Ableitöffnungen (11,12,42,43;11,12,46-49) für das erste und zweite Trägermedium (C,E) und für das aufzutrennende Substanzgemisch (S) vorgesehen sind, welche Zuleit- bzw. Ableitöffnungen im Deckel und/oder im Materialplättchen angeordnet sind.
- 50 12. Vorrichtung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennstrecken (2,4,4A-4J) als Gräben ausgebildet sind, deren Tiefe etwa 0.1  $\mu\text{m}$  bis etwa 1000  $\mu\text{m}$  beträgt, und deren Breite etwa 1  $\mu\text{m}$  bis etwa 500  $\mu\text{m}$  beträgt, wobei immer jeweils schmale Gräben eine grosse Tiefe besitzen und umgekehrt.
- 55 13. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägermedien (C,E) vorzugsweise wässrige Elektrolyten sind, welche mit Hilfe elektrischer Felder durch das Kanalsystem (21,2,22) und die Trennstrecken (2,4,4A-4J) transportiert werden.
14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägermedien (C,E) stationäre Gele sind.



15. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Kanalsystem (21,2,22) und die Trennstrecken (2,4,4A-4J) ein- oder zweiseitig offen ausgebildet sind.
16. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Kanalsystem (21,2,22) die Trennstrecken (2,4,4A-4J) und allfällige Verlängerungskanäle (41,41A-41J) in den Gelen ausgebildet sind und dreiseitig offen sind.
17. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Winkel ( $\alpha$ ), unter dem die zweite (4) bzw. die weiteren (4,4A-4J) Trennstrecken gegenüber der ersten Trennstrecke (2) geneigt angeordnet sind, etwa  $30^\circ$ - $150^\circ$ , vorzugsweise etwa  $90^\circ$  beträgt.
18. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Detektor für das in seine Komponenten aufgetrennte Substanzgemisch (S) vorgesehen ist.
19. Verfahren zur elektrophoretischen Trennung von komplexen fluiden Substanzgemischen entlang einer Trennstrecke, bei dem flussaufwärts der Trennstrecke (2) ein komplexes Substanzgemisch (S) in das Trägermedium (C) injiziert wird und anschliessend in einem elektrischen Feld, das entlang der Trennstrecke (2) angelegt wird, getrennt wird, dadurch gekennzeichnet, dass das teilweise aufgetrennte Substanzgemisch (S) flussabwärts der Trennstrecke (2) in ein zweites Trägermedium (E) injiziert wird, welches in wenigstens einer zweiten Trennstrecke (4;4,4A-4J) enthalten ist, die unter einem Winkel ( $\alpha$ ) gegenüber der ersten (2) geneigt verläuft, und dass das Substanzgemisch (S) in einem entlang der zweiten Trennstrecke in dem zweiten Trägermedium (E) herrschenden elektrischen Feld weiter aufgetrennt wird.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Injektion des Substanzgemisches (S) in das erste (C) bzw. in das zweite Trägermedium (E) mit Hilfe von Injektionsvorrichtungen (3,5,5A-5J) durchgeführt wird, deren Injektionsvolumina durch die Ausbildung der Kreuzungsbereiche der Trennstrecken (2,4,4A-4J) geometrisch definiert ist.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Substanzgemisch (S) zur Injektion in das erste (C) bzw. in das zweite Trägermedium (E) entlang eines Doppel-T Stücks geführt wird, dessen Balken jeweils von der Trennstrecke (2,4,4A-4J) bzw. deren geradliniger Verlängerung (21,41,41A-41J) gebildet wird.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 19-21, dadurch gekennzeichnet, dass das teilweise aufgetrennte Substanzgemisch (S) in eine Anzahl von flussabwärts der ersten Trennstrecke (2) hintereinander und etwa parallel zueinander und gegenüber der ersten Trennstrecke (2) um einen Winkel ( $\alpha$ ) geneigt verlaufenden weiteren Trennstrecken (4,4A-4J) injiziert wird, wo es in den jeweils angelegten elektrischen Feldern parallel weiteraufgetrennt wird.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 19-22, dadurch gekennzeichnet, dass das teilweise aufgetrennte Substanzgemisch (S) in der (den) zweiten Trennstrecke(n) (4,4A-4J) in eine Richtung bewegt wird, die mit ihrer Bewegungsrichtung in der ersten Trennstrecke (2) einen Winkel ( $\alpha$ ) von etwa  $30^\circ$ - $150^\circ$ , vorzugsweise etwa  $90^\circ$  einschliesst.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die aufgetrennten Komponenten des Substanzgemisches (S) zu einem bestimmten Zeitpunkt mit Hilfe einer Kamera optisch zweidimensional in zwei Ortskoordinaten detektiert werden.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die aufgetrennten Komponenten des Substanzgemisches (S) mit einem linear scannenden optischen Detektor über Erfassung der Orts- und Zeitkoordinaten erfasst werden.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 22-25, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert des zweiten Trägermediums (E) derart beeinflussbar ist, dass das zweite Trägermedium (E) in den einzelnen Trennstrecken (4,4A-4J) jeweils einen anderen pH-Wert aufweisen, und dass sich zwischen den in benachbarten Trennkanälen enthaltenen Trägermedien (E) ein pH-Gradient einstellt.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass das erste Trägermedium (C) in der ersten Trennstrecke (2) verschieden von dem zweiten Trägermedium (E) gewählt wird.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass als Trägermedien (C,E) mobile Elektrolytlösungen oder vorzugsweise stationäre Gele gewählt werden.

5

10

15

20

25

30

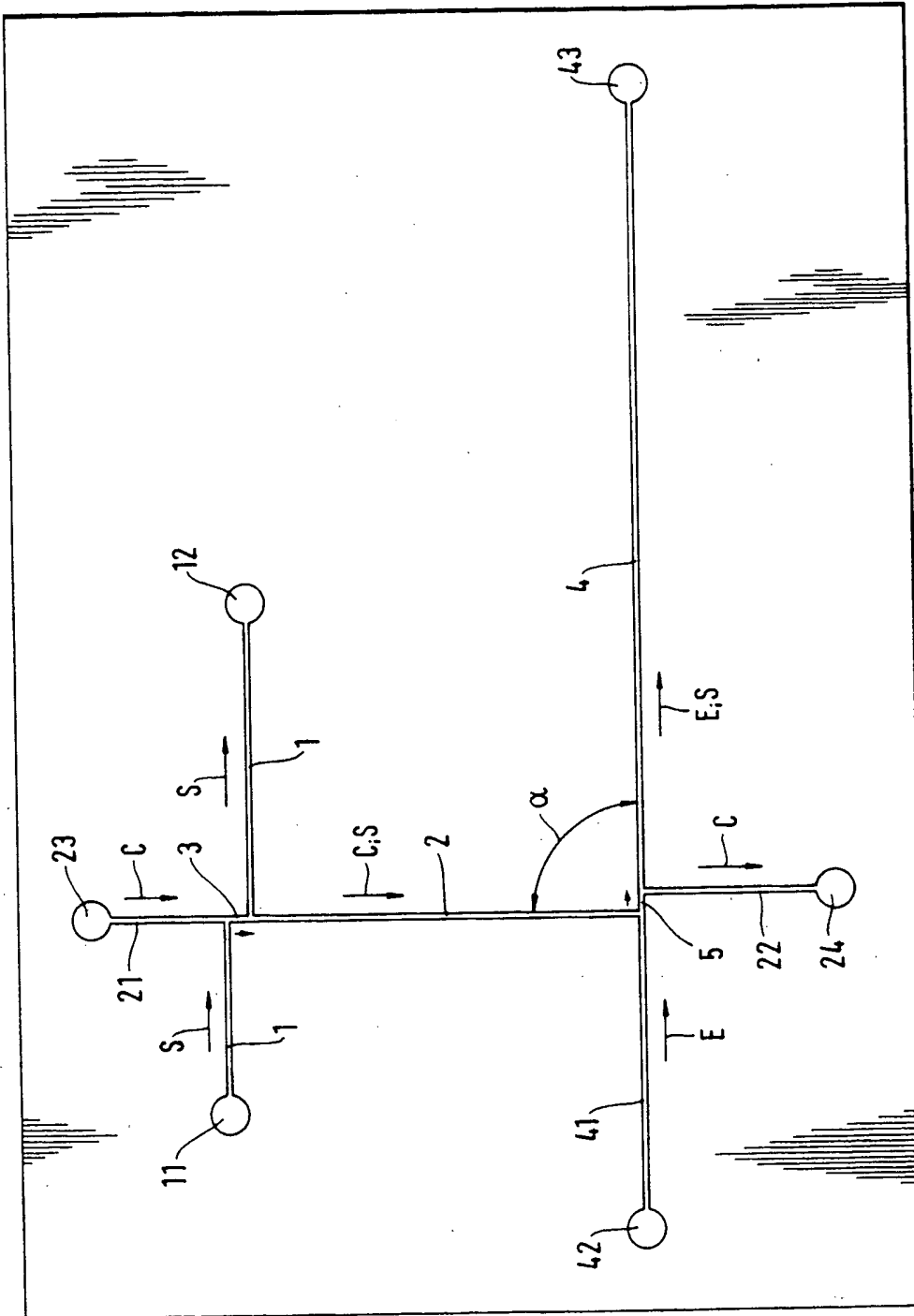
35

40

45

50

55



**Fig. 1**

